Isolierung und Charakterisierung eines Propanidid spaltenden Enzyms aus Rattenleber

Dissertation
zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität des Saarlandes

—

von

Margarete Quintenz

—

Saarbrücken
1970

—

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES PROPANIDID SPALTENDEN ENZYMS AUS RATTENLEBER

Dissertation
zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von

Margarete Quintenz
Saarbrücken
1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag des Kolloquiums: 8. Januar 1970

Dekan: Prof. Dr. H.D. DIETZE

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. R. AMMON

Prof. Dr. H. J. BIELIG

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. R. AMMON, danke ich für die Überlassung und die wohlwollende Förderung meiner Arbeit.

Ferner danke ich Frau Professor Dr. G. WERTH, Herrn Dozent Dr. H.J. HAAS, Herrn Dr. V. KAMPHUES und Herrn Diplomchemiker K.H. SCHNABEL für wertvolle Ratschläge.

Isolierung und Charakterisierung eines Propanidid spaltenden Enzyms aus Rattenleber

Inhalt

		Seite
1.	Einleitung und Themenstellung	5
2.	Ergebnisse	9
2.1	Leberhomogenat	
2.1.1	Herstellung	
2.1.2	Enzymaktivität	
2.1.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	
2.1.4	Differentialzentrifugation	
2.2	Prüfung des Homogenats	11
2.2.1	Optimale Substratkonzentration	
2.2.2	pH Optimum	
2.3	Anreicherung des Enzyms	12
2.3.1	Fällung mit Ammoniumsulfat	
2.3.2	Gelfiltration an Sephadex G 100	
2.3.3	Chromatographie an DEAE-Sephadex	
2.4	Untersuchung der Reinheit des angereicherten Enzyms	15
2.4.1	Rechromatographie	
2.4.2	Elektrophorese	
2.4.3	UV-Absorption	
2.4.4	Verhalten in der analytischen Ultrazentrifuge	

Seite

2.5 Eigenschaften des angereicherten Enzyms 19

2.5.1 Michaeliskonstante

2.5.2 Haltbarkeit

2.5.3 Substratspezifität

2.5.3.1 Acetylsalicylsäure

2.5.3.2 Phenylacetat

2.5.3.3 Phenylbutyrat

2.5.3.4 Phenylbenzoat

2.5.3.5 Acetylcholin

2.5.3.6 Atropin

2.5.3.7 Cocain

2.5.3.8 Dolantin

2.5.3.9 Caramiphen (Parpanit^{R})

2.5.3.10 Procain

2.5.3.11 Tributyrin

2.5.3.12 L-Tyrosinäthylester

2.5.3.13 Olivenöl

2.6 Einfluß von Metallsalzen 23

2.7 Einfluß von Inhibitoren 24

2.8 Verhalten der Esterase nach Leberschädigung 27

3. Diskussion 28

4. Zusammenfassung 37

5. Experimenteller Teil 39

5.1 Allgemeines 39

5.2 Verwendete Chemikalien 39

5.3 Versuchsbeschreibungen 41

6. Literatur 54

1. Einleitung und Themenstellung

Propanidid (3 Methoxy-4-(N, N-diäthylcarbamoylmethoxy)phenylessigsäure-n-propylester, Abb. 1) ist ein sehr gut verträgliches Ultrakurznarkotikum, das erstmals von R. HILTMANN (13) synthetisiert wurde, und dessen pharmakologische Eigenschaften von W. WIRTH und F. HOFFMEISTER (31) untersucht wurden. Die zunächst bei Hunden und Katzen festgestellte kurze Narkosedauer hat sich später auch klinisch bestätigen lassen. Nach i.v.-Verabreichung von 500 mg dauert die Narkose beim Menschen 3-5 min.

J. PÜTTER (23) untersuchte, ob die außerordentlich kurze Narkosedauer durch einen sehr schnellen enzymatischen Abbau des Narkotikums erklärt werden kann oder ob andere Mechanismen, wie z.B. schnelle Verschiebung der Organverteilung, dafür verantwortlich sind. Nach allgemeinen Erfahrungen über den Metabolismus von Substanzen ähnlicher chemischer Struktur konnte mit folgenden fermentativ katalysierten Abbaureaktionen gerechnet werden:

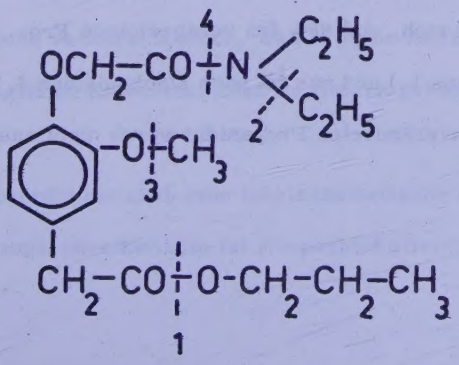


Abb. 1:

1. Hydrolyse der Esterbindung,
2. Entäthylierung,
3. Entmethylierung,
4. Abspaltung der Diäthylaminogruppe,
5. Hydroxylierung des aromatischen Kerns.

Man darf annehmen, daß die unter 2. bis 5. genannten Reaktionen nur eine untergeordnete Rolle bei der Metabolisierung des Propanidids spielen, da bekannt ist, daß enzymatisch katalysierte Esterhydrolysen (Reaktion 1) wesentlich schneller verlaufen.

Wäre eine rasche Esterspaltung der Grund für die Verkürzung der Narkose, müßte die entstehende Säure 3-Methoxy-4-(N,N-diäthylcarbamoylmethoxy phenylessigsäure, MDP narkotisch unwirksam sein, was auch von WIRTH und HOFFMEISTER (31) nachgewiesen wurde. Als Beweis für die im Organismus stattfindende enzymatische Esterspaltung dienen Ergebnisse von in-vitro-Versuchen. Dabei konnte MDP nicht nur papierchromatographisch nachgewiesen, sondern auch kristallin isoliert werden. Bei in-vivo-Versuchen zeigte sich, daß 98% des verabreichten Propanidids nach Mechanismus 1.) und nur 2% nach Mechanismus 4.) metabolisiert werden. Unverändertes Propanidid wurde nicht ausgeschieden.

Die Metaboliten wurden unabhängig von intravenöser oder oraler Applikation des Narkotikums zu 94% renal und zu 6% faecal ausgeschieden. Nach 2 Stunden waren 90% der verabreichten Menge eliminiert, wobei sich die Ausscheidungsgeschwindigkeit als dosisunabhängig erwies (11).

Der therapeutische Index von Propanidid ist ähnlich wie die Indices von Thiopental und Hexobarbital. Propanidid zeigt als echtes Narkotikum einen Antagonismus gegen zentral wirkende Analeptika vom Typ des Pentretrazols und des Bemigrids. Einerseits werden nicht nur die durch Barbiturate, sondern auch die durch Propanidid bei Ratten erzeugten Narkosen durch diese Analeptika reduziert. Andererseits wird durch Propanidid die krampferzeugende Wirkung der Analeptika herabgesetzt.

Bekannt ist die durch Chlorpromazin hervorgerufene Verlängerung der narkotischen Wirkung von Hexobarbital. Auch eine durch Propanidid erzeugte Narkose wird durch vorherige Gabe von Chlorpromazin verlängert. Durch Iproniazid kann eine Propanididnarkose verkürzt werden, was auf eine Anreicherung von zentral erregenden Katecholaminen im Gehirn zurückzuführen ist.

Propanidid hat auch eine lokalanästhetische Komponente. Als Leitungsanaesthetikum ist Propanidid allerdings nur halb so

wirksam wie Baycain, aber dem Procain um das Doppelte überlegen.

Zur Herstellung gut verträglicher injizierbarer wässriger Lösungen von Propanidid dient Cremophor EL ^{R} als weitgehend untoxischer Lösungsvermittler. In 20-prozentigen wässrigen Lösungen des Emulgators sind bis zu 5% des Narkotikums löslich. Derartige Lösungen, die als Epontol ^{R} im Handel sind, können mit Wasser oder mit physiologischer Kochsalzlösung beliebig verdünnt werden, ohne, daß der Wirkstoff ausfällt. Beim Erhitzen auf Temperaturen über 50^{o} tritt eine reversible Trübung auf, ohne, daß die Injektionslösungen unbrauchbar werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Enzym, das Propanidid im Sinne der Reaktion 1.) spaltet, d.h. eine Esterase, aus Rattenleber angereichert und einige seiner Eigenschaften näher untersucht und mit einem entsprechenden, durch J. Pütter aus Humanserum angereicherten Enzym verglichen.

2. Ergebnisse

(Genaue Versuchsbeschreibung siehe S.36)

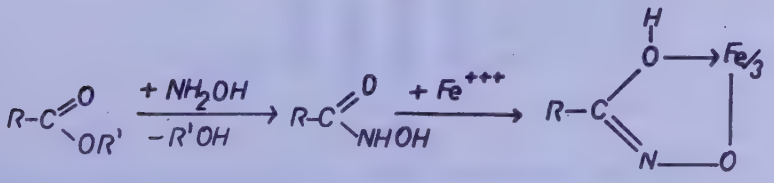
2.1 Leberhomogenat

2.1.1 Herstellung (vgl. 5, 3, 1)

Das Homogenat wurde mittels der von E.G. BALL und O. COOPER (8) beschriebenen „Acetonpulvermethode" gewonnen, wobei zerkleinertes Lebergewebe mit Hilfe von kaltem Aceton schnell entwässert wird. Dabei werden die Zellen zerstört und die Bindungen der enzymatisch wirksamen Proteine an Lipide gelöst, ohne daß eine Proteindenaturierung eintritt. Die bei Bedarf in geeigneten Puffern hergestellten Suspensionen derartiger Präparate werden als „Homogenate" bezeichnet.

2.1.2 Enzymaktivität (vgl. 5.3.2)

Die Enzymaktivitäten wurden in Anlehnung an die von S. HESTRIN (12) entwickelte Fe^{+++}-Hydroxamatreaktion zum quantitativen Nachweis von Estern bestimmt (16). Man arbeitet dabei in einem Substratüberschuß und ermittelt den Anteil an gespaltenem Ester durch Differenzmessung.



2.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (vgl. 5.3.3)

Die Eiweißkonzentration wurde photometrisch nach der von H. M. KALCKAR (14) angegebenen Vorschrift bestimmt.

2.1.4 Differentialzentrifugation (vgl. 5.3.4)

Um festzustellen, ob das Enzym wie die meisten am Stoffwechsel von Pharmaka beteiligten Fermente in der Mikrosomenfraktion lokalisiert ist, wurde eine Differentialzentrifugation nach der von W. C. SCHNEIDER (27) und D. B. ROODYN (26) publizierten Methode durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten der Zellkerne, der Mitochondrien, der Mikrosomenfraktion, des Cytoplasmas und des Gesamthomogenats sind in Abb. 3 dargestellt.

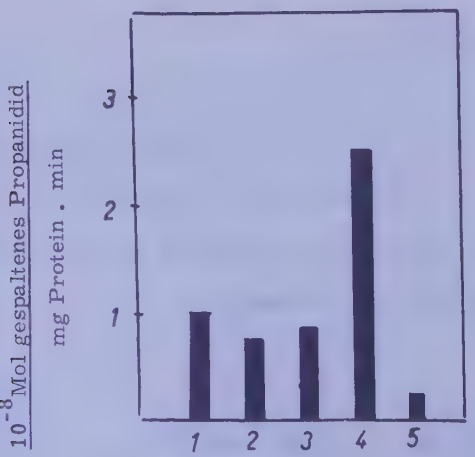


Abb. 3: Intrazelluläre Verteilung der Propanidid spaltenden Esterase. 1: Homogenat; 2: Zellkerne; 3: Mitochondrien; 4: Mikrosomenfraktion; 5: Cytoplasma.

Man sieht, daß sich die weitaus höchsten spezifischen Aktivitäten in der Mikrosomenfraktion finden. Die in den Kernen und in den Mitochondrien gemessenen geringen Aktivitäten sind vermutlich auf die kaum völlig zu vermeidende Verunreinigung dieser Fraktionen mit Mikrosomen zurückzuführen. Das Cytoplasma enthält praktisch keine Aktivität.

2.2. Prüfung des Homogenats

2.2.1 Optimale Substratkonzentration

Eine Propanididverdünnungsreihe ($7,5.10^{-3}$ bis $1,5.10^{-3}$ M) wurde mit gleichbleibenden Mengen an Leberhomogenat inkubiert. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, steigt die Enzymaktivität bis zu einer Propanididkonzentration von $6x10^{-3}$ Mol/1000 ml an und fällt dann rapide wieder ab. Das Substratoptimum liegt also bei 12 mg Propanidid in 6 ml Inkubationsansatz

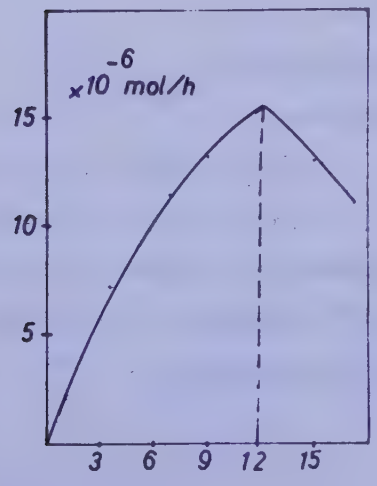


Abb. 4:
Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration

2.2.2 pH-Optimum

Die Enzymaktivität wurde über einen Bereich von pH 7, 0 bis 11, 0 verfolgt. Abb. 5 zeigt ein deutliches pH-Optimum bei pH 9, 0.

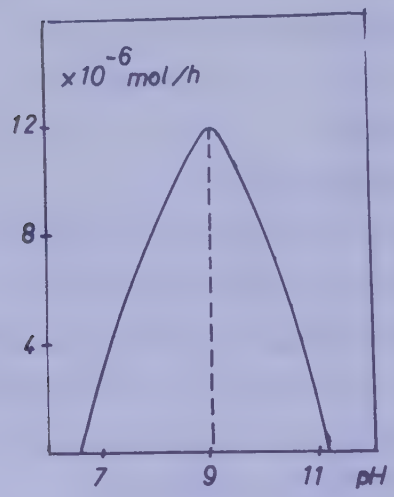


Abb. 5:
pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität

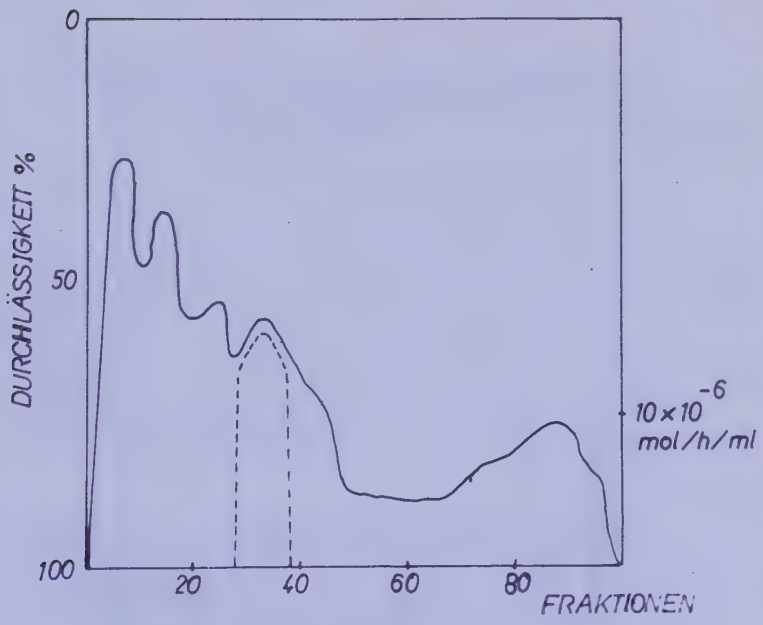
2.3 Anreicherung des Enzyms (vgl. 5.4)

2.3.1 Fällung mit Ammoniumsulfat

Nach 2.1.1 gewonnenes Homogenat wurde 60 min bei 8500 g zentrifugiert und der leicht trübe, tiefrote Überstand mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Die im Bereich von 46 bis 73 proz. Sättigung (1, 4 - 2, 2 M) ausfallende Fraktion wurde abzentrifugiert und in Tris-Puffer gelöst.

2.3.2 Gel-Filtration an Sephadex G 100

Die nach 2.3.1 erhaltene Proteinfraktion wurde an Sephadex G-100 chromatographiert. Das Ergebnis ist in Abb. 6 wiedergegeben.



——— = Durchlässigkeit

------- = Aktivität des Enzyms

Abb. 6: Auftrennung der nach 2.3.1 erhaltenen Fällung durch Chromatographie an Sephadex G-100.

Die enzymatisch aktiven Fraktionen (Nr. 28-39) wurden nach der von A. KOHN (17) angegebenen Methode eingeengt.

2.3.3 Chromatographie an DEAE-Sephadex

Das nach 2.3.2 erhaltene Konzentrat wurde auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen und mittels eines Kochsalzgradienten eluiert. Abb. 7 zeigt das Ergebnis

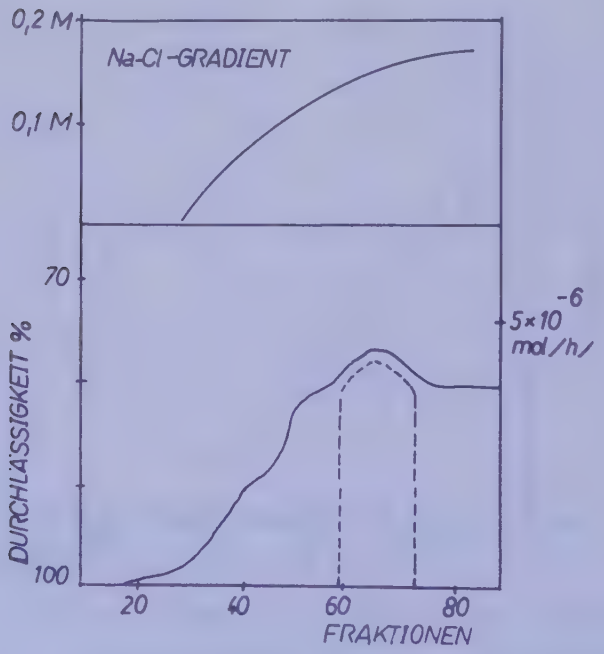


Abb. 7: Auftrennung des nach 2.3.2 erhaltenen Konzentrates an DEAE Sephadex

——— = Durchlässigkeit

------- = Aktivität des Enzyms

Die enzymatisch aktiven Fraktionen (Nr. 59 - 73) wurden wie bei 2.3.2 eingeengt, gegen einen Puffer von pH 9,0 ausdialysiert und bei -15° aufbewahrt.

Die durch die von 2.3.1 bis 2.3.3 geschilderten Schritte erzielte Anreicherung ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Anreicherung der Propanidid spaltenden Esterase durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung und Chromatographie an Sephadex G-100 und an DEAE-Sephadex

	Homogenat	2.3.1	2.3.2	2.3.3
spez. Aktivität (Mol/min/mg Protein	$9,0.10^{-9}$	$22,2.10^{-9}$	$4,6.10^{-7}$	$5,6.10^{-7}$
Anreicherung		2,4	51,1	62,2

2.4 Untersuchung der Reinheit des angereicherten Enzyms

2.4.1 Rechromatographie

Das nach 2.3.3 erhaltene, eingeengte Eluat wurde erneut an DEAE-Sephadex mittels eines Kochsalz-Gradienten chromatographiert, das Eluat eingeengt und gegen Tris-Puffer (0,05 M, pH 9,0) dialysiert.

Das Diagramm der Rechromatographie, das nur noch einen

Peak zeigt, ist aus Abb. 8 zu ersehen.

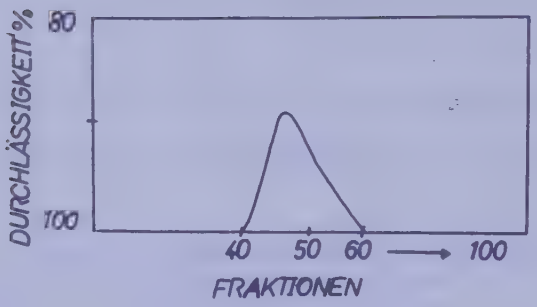


Abb. 8: Rechromatographie des nach 2.3 angereicherten Enzyms

2.4.2 Elektrophorese

Die Mikrozonenelektrophorese des angereicherten Enzyms ergab nur eine einzige Bande, die durch Vergleich mit einem unter gleichen Bedingungen erhaltenen Pherogramm von Rattenserum einem ß-Globulin zuzuordnen ist.

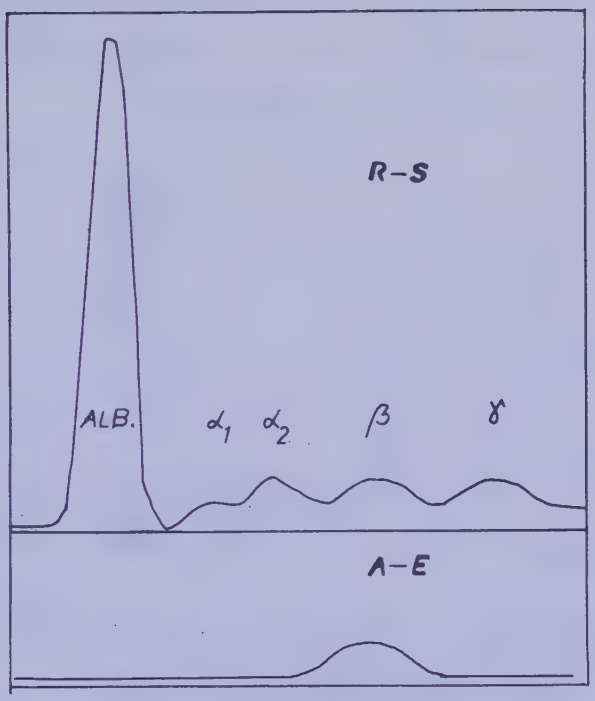


Abb. 9: Pherogramm von nach 2.3 angereichertem Enzym und von Rattenserum.
R-S: Rattenserum, A-E: angereichertes Enzym.

2.4.3 UV-Absorption

Die hellgelben Lösungen des rechromatographierten Enzyms (2.4.1) zeigen im Bereich von 550 nm eine geringe Absorption, was auf Anwesenheit von Spuren Hämoglobin schließen läßt. In Abb. 9 ist das Protein-Spektrum des Enzyms mit einem

Absorptionsmaximum bei 280 nm wiedergegeben. Der Extinktionsquotient $\frac{E_{280}}{E_{260}}$ beträgt 2,7, was durch Verunreinigung mit Purin-Nucleotiden verursacht wird (18).

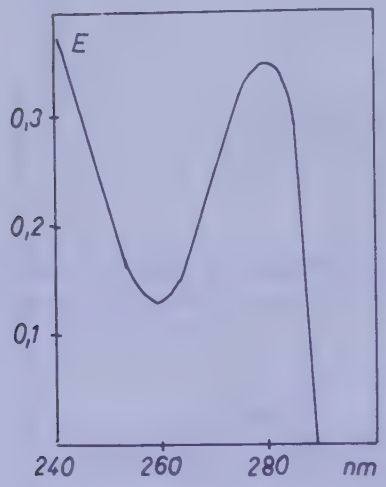


Abb. 10: UV-Absorption des nach 2.4.1 rechromatographierten Enzyms.

2.4.4 Verhalten in der analytischen Ultrazentrifuge

Abb. 11: Sedimentationsverhalten der Propanidid spaltenden Esterase aus Rattenleber in der analytischen Ultrazentrifuge der Fa. Beckmann, Modell E, Rotor An-D, Standard-Zelle, 60 000 UPM, Winkel 45°.

2.5 Eigenschaften des angereicherten Enzyms

Das Substratoptimum (6×10^{-3} M) und das pH-Optimum (9, 0) des angereicherten Enzyms sind identisch mit den mit Leberhomogenat erhaltenen Werten.

2.5.1 Bestimmung der Michaeliskonstanten

Die Michaeliskonstante für die enzymatische Propanididspaltung beträgt

$$K_m = 2,8 \cdot 10^{-2} M$$

was für eine relativ geringe Spezifität des Enzyms spricht.

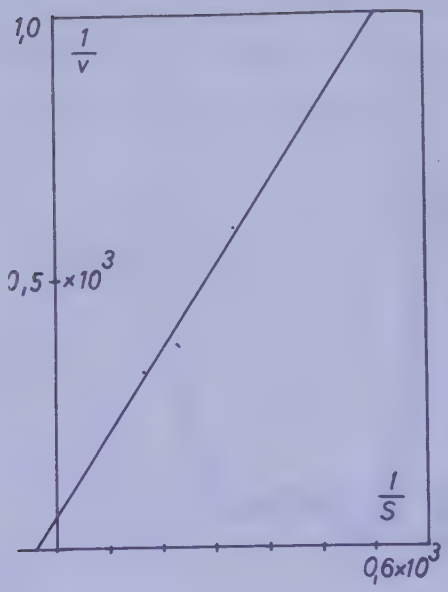


Abb. 12: Michaeliskonstante des nach 2.3 angereicherten Enzyms.

2.5.2 Haltbarkeit

Die Haltbarkeit des Enzyms wurde bei 3-7° und bei 20-22° in Abständen von 1, 3 und 7 Tagen getestet. Bei Aufbewahrung bei 3-7° konnte innerhalb von 7 Tagen kein Aktivitätsverlust festgestellt werden. Bei Aufbewahrung bei 20-22° erfolgte innerhalb von drei Tagen ein Aktivitätsverlust von 50%, nach sieben Tagen war die Aktivität auf ein Drittel des Ausgangswertes gesunken.

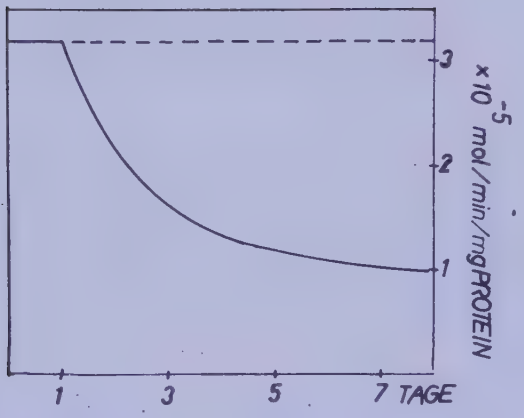


Abb. 13: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Aufbewahrungstemperatur
----- Aufbewahrung bei 3-7°
——— Aufbewahrung bei 20-22°

2.5.3 Prüfung der Substratspezifität

Die in Tabelle 2 angegebenen Ester wurden als Substrate bei der bei 37° durchgeführten enzymatischen Aktivitätsprüfung des angereicherten Enzyms eingesetzt. Die H^+-Konzentrationen der Inkubationsansätze entsprachen den pH-Optima der für die einzelnen Substrate spezifischen Enzyme.

Tabelle 2: Spezifität des nach 2.3 angereicherten Enzyms

Substrat	Spez. Aktivität (Mol/mg Protein/min)	Substrat-konzentration	pH	Literatur
Propanidid	$5,6.10^{-7}$	6.10^{-3} M	9,0	--
Acetylsalicylsäure	$1,17.10^{-7}$	22.10^{-2} M	7,0	(9)
Phenylacetat	$1,6.10^{-6}$	1.10^{-2} M	7,4	(9)
Phenylbutyrat	$0,91.10^{-6}$	1.10^{-2} M	7,4	(9)
Phenylbenzoat	$2,6.10^{-7}$	1.10^{-2} M	7,4	(9)
Acetylcholin	0	5.10^{-2} M	8,2	(2)
Atropin	0	12.10^{-2} M	7,6	(4)
Cocain	0	12.10^{-2} M	7,6	(4)
Dolantin	0	5.10^{-4} M	9,3	(3)
Caramiphen	0	$5,5.10^{-5}$ M	7,2	(22)
Procain	0	2.10^{-4} M	8,2	(21, 19)
Tributyrin	0	66.10^{-2} M	8,6	(10, 20, 24)
L-Tyrosinäthylester	0	2.10^{-3} M	7,0	(25)
Olivenöl	0	120 ml/1000 ml	9,1	(20)

Zusätzlich zu den in Tabelle 2 zusammengefaßten Untersuchungen wurde dünnschichtchromatographisch geprüft, ob Glycyl-L-Prolin und L-Leucylglycin durch das Enzym gespalten wird. Es zeigte sich, daß die beiden Dipeptide nicht angegriffen werden.

2.6 Einfluß von Metallsalzen

Die Aktivität des gereinigten Enzyms gegen Propanidid wurde in Gegenwart der in Tabelle 3 angegebenen Salze untersucht. Die Enzymaktivität ohne jeglichen Zusatz wurde gleich 100 gesetzt.

Tabelle 3: Aktivität des gereinigten Enzyms bei Zusatz einiger Salze

Salz	Konzentration	Aktivität
$MgCl_2$	10^{-3} M	100
$MnSO_4$	10^{-3} M	91
$ZnSO_4$	10^{-4} M	100
$CaCl_2$	10^{-3} M	100
$FeSO_4$	10^{-4} M	85
$CoCl_2$	10^{-3} M	100
$CuSO_4$	10^{-3} M	76
$(NH_4)_2SO_4$	10^{-1} M	100

Man sieht, daß in keinem Fall eine Aktivierung des Enzyms stattfand; nennenswerte Hemmungen durch Metallsalze konnten ebenfalls nicht beobachtet werden.

2.7 Einfluß von Inhibitoren

Nach der bei 5.3.2 angegebenen Methode wurde die Aktivität des Enzyms in Gegenwart der in Tabelle 4 verzeichneten Inhibitoren festgestellt (Aktivität des Enzyms ohne jeglichen Zusatz = 100).

Tabelle 4: Aktivität des gereinigten Enzyms bei Zusatz üblicher Inhibitoren

Inhibitor	Konzentration	Aktivität
Ca-oleat	5.10^{-3} M	13,8
SKF A^{+}	1.10^{-4} M	88,8
Trasentin 6 H^{++}	1.10^{-3} M	100
α,α'-Dipyridyl	1.10^{-3} M	100
KCN	1.10^{-3} M	100
NaF	1.10^{-3} M	81
Neostigmin	1.10^{-4} M	100
" "	1.10^{-3} M	100
Physostigmin	1.10^{-5} M	100
" "	1.10^{-4} M	82
Atoxyl	1.10^{-2} M	0
"	1.10^{-3} M	0
p-Chloromercuribenzoesaure-Na-Salz	1.10^{-4} M	100
Na-Monojodacetat	1.10^{-3} M	78
EDTA	1.10^{-3} M	100
Cystein	1.10^{-3} M	100
o-Phenanthrolin	$0,5.10^{-3}$ M	100
E 600^{+++}	1.10^{-5} M	positiv
	1.10^{-4} M	positiv
DFP^{++++}	1.10^{-5} M	positiv
	1.10^{-4} M	positiv

\+ Diphenylpropylessigsäure - diäthylaminoäthylester. HCl

++ Phenylcyclohexylessigsäure-diäthylaminoäthylester. HCl

+++ Diäthyl-p-nitrophenylphosphat

++++ Diisopropylfluorphosphat

Der Einfluß von E 600 und DFP wurde dünnschichtchromatographisch untersucht. Wie das in Abb. 14 wiedergegebene Chromatogramm zeigt, wird die Propanidid spaltende Esterase durch DFP und E 600 nicht beeinflußt.

Abb. 14: Dünnschichtchromatographische Untersuchung des Einflusses von DFP und E 600 auf die Propanidid spaltende Esterase

Bahn 1: Enzym + Propanidid

Bahn 2: Enzym + Propanidid + DFP 10^{-4} m

Bahn 3: Enzym + Propanidid + DFP 10^{-5} m

Bahn 4: Enzym + Propanidid + E 600 10^{-4} m

Bahn 5: Enzym + Propanidid + E 600 10^{-5} m

Bahn 6: M D P

Bahn 7: Propanidid

Die stärkste Hemmung erfährt das Enzym durch den für Leberesterasen typischen Hemmstoff Ca-oleat und durch Atoxyl. Die Komplexbildner α, α' Dipyridyl, o-Phenanthrolin und EDTA bewirken keine Hemmung, was darauf schließen läßt, daß das Enzym kein Metall enthält.

8 Verhalten der Esterase nach Leberschädigung

Ratten (ca. 200 g) wurde Thioacetamid (25 mg/kg) in die Schwanzvene gespritzt. Nach 3, 6, 9, 12, 24 und 36 Stunden wurde anhand der Erhöhung der Serum-Transaminasen das Ausmaß der durch Thioacetamid hervorgerufenen Lebernekrosen ermittelt (5). Während im Vergleich zu gesunden Tieren die Glutamat-Oxalacetat- und die Glutamat-Pyruvat-Transaminasen bereits nach 3 Stunden im Serum signifikant erhöht waren und ihr Maximum nach 6 Stunden erreicht hatten, blieb die Propanidid spaltende Aktivität des Serums unverändert. Vorherige Verabreichung von Thioacetamid hatte auch keinen Einfluß auf die Dauer der durch Propanidid erzeugten Narkose. Eine Erklärung hierfür steht noch aus.

3. Diskussion

Wie bereits bei 1. angedeutet wurde, können sowohl die rasche Metabolisierung als auch Besonderheiten der Organverteilung die Ursache für die außergewöhnliche Kürze der durch Propanidid bewirkten Narkose sein. Vergleicht man Propanidid mit den sonst üblichen, aber länger wirkenden Injektionsnarkotika Hexobarbital-Na und Thiopental, so sieht man, daß Propanidid eine Mittelstellung zwischen den beiden Barbituraten einnimmt. Die durch N-methylierte Barbiturate (Hexobarbital-Na) erzeugte Narkose wird durch schnellen enzymatischen Abbau und rasche renale Ausscheidung beendet. Dagegen wird Thiopental nicht abgebaut. Die Thiopental-Narkose endet, weil diese Substanz als sehr gut fettlösliches Thiobarbiturat aus dem Zentralnervensystem verschwindet, im Fettgewebe angereichert und nur langsam ausgeschieden wird. Bei der Beendigung der Propanididnarkose spielen sowohl die rasche Metabolisierung und Ausscheidung als auch die Organverteilung eine Rolle, was aus Abb. 15 hervorgeht.

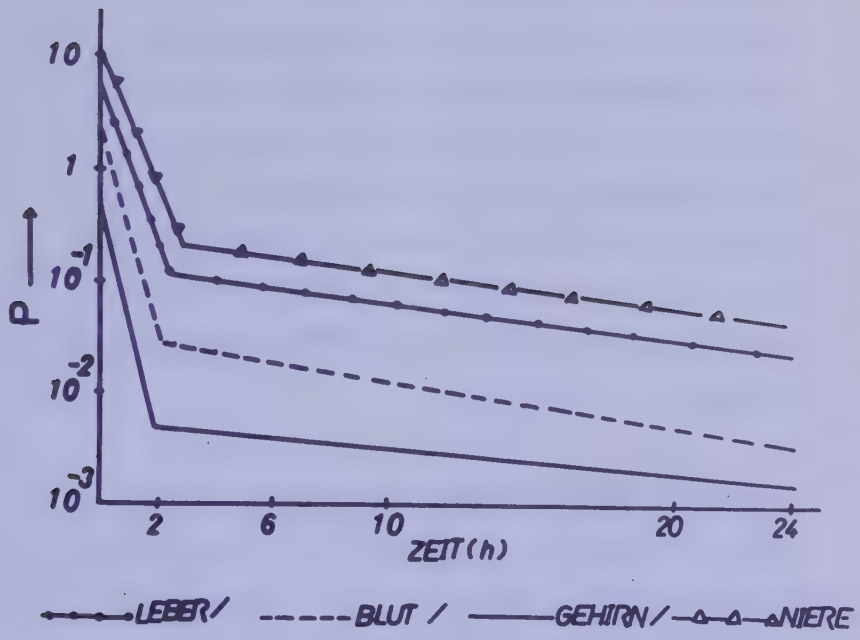


Abb. 15: Aktivitätskonzentrationen in Niere, Leber, Blut, Gehirn von Ratten nach i.V-Applikation von 50 mg/kg Propanidid. P = Dosisverhältnis = Quotient aus im Organ gemessener Aktivitätskonzentration und der im Gesamttier zum Zeitpunkt der Applikation vorhandenen mittleren Konzentration (11, S. 84). In den Aktivitätskonzentrationen sind die Aktivitäten von Propanidid und seiner ^{14}C-haltigen Metaboliten enthalten.

Man sieht, daß unmittelbar nach Applikation Propanidid bzw. seine Metaboliten bevorzugt nicht nur in der Leber, sondern auch in den Nieren zu finden sind, was für eine schnell einsetzende renale Ausscheidung dieser Substanzen spricht. Die von Anfang an wesentlich geringere Konzentration im Gehirn fällt nicht nur sehr schnell ab, sondern vermindert sich zudem mit größerer Geschwindigkeit als die Konzentrationen in Nieren und Leber. Die Konzentrationen in den weiterhin gemessenen Organen liegen während der Versuchszeit zwischen denen von Leber und Gehirn.

Propanidid wird daher, ähnlich wie Hexobarbital, schnell in Form seiner Metaboliten ausgeschieden. Die zeitliche Änderung der Organverteilung erfolgt also nicht wie bei Thiopental durch eine Rückverteilung vom Zentralnervensystem in das Fettgewebe. Man darf daher annehmen, daß Propanidid durch das Blut vom Gehirn in die Leber transportiert wird und dabei von einer Serumesterase und dann durch eine Leberesterase inaktiviert wird. Diese Annahme stützt sich auch auf die Tatsache, daß die Narkose nach wiederholter Injektion von Thiopental verlängert wird, da dadurch die Rückverteilung durch Thiopentalakkumulation im Fettgewebe immer mehr erschwert wird, während Propanidid bei wiederholter Injektion keine Narkoseverlängerung bewirkt, weil bei der raschen Abflutung aus dem Gehirn die Substanz nicht im Fettgewebe akkumuliert, sondern im Blut bzw. in der

Leber metabolisiert wird. Messungen mit Blutsera verschiedener Tierarten ergaben extreme Unterschiede der Metabolisierungsgeschwindigkeiten. Setzt man die Abbaugeschwindigkeit des menschlichen Serums = 100, so ergaben sich folgende relative Werte:

Hund	= 0
Katze	= 0
Hammel	= 4, 5
Kaninchen	= 5, 5
Meerschweinchen	= 380
Maus	= 3300
Ratte	= 4500

Da man aus klinischen Erfahrungen mit Halbwertzeiten von etwa 3 min zu rechnen hat, erscheint es sehr wahrscheinlich, daß die schnelle Metabolisierung nicht alleine im Blut erfolgt. Versuche mit verschiedenen Kaninchenorganen zeigten tatsächlich, daß eine hohe Propanidid spaltende Aktivität in der Leber, eine etwa zehnmal kleinere in den Nieren, dagegen keine Aktivität im Gehirn und im Herzen zu finden war. An menschlichem Sektionsmaterial wurde gezeigt, daß eine 15mal höhere Aktivität in der Leber als im Blutplasma vorhanden ist. J. PÜTTER (23a) reicherte aus Humanserum eine Propanidid spaltende Esterase an, die aufgrund ihrer Substratspezifität und ihrer Hemmbarkeit durch kleine Konzentrationen an Prostigmin zur Gruppe der

Pseudocholinesterase gerechnet werden muß. Die Substratspezifität und die Hemmbarkeit der aus Rattenleber angereicherten Esterase zeigen charakteristische Unterschiede gegen diese Pseudocholinesterase (s. Tabelle 5). Allein schon deshalb scheint es sicher, daß die beiden Esterasen verschieden sind.

Um die unspezifische Propanidid spaltende Esterase aus Rattenleber von anderen Pharmaka spaltenden Esterasen und gegen Pseudocholinesterase abzugrenzen, soll auf die Eigenschaften dieser Enzyme eingegangen werden.

1. Pseudocholinesterase

Die Pseudocholinesterase ist ein sehr unspezifisches Enzym, das eine Reihe von Cholinestern spaltet. Darüber hinaus katalysiert das Ferment aber auch die Hydrolyse von Triacetin und Tributyrin. Charakteristisch ist, daß Butyrylcholin schneller gespalten wird als Acetylcholin oder Ester des Cholins mit höheren Fettsäuren. Pseudocholinesterase, die daher auch Butyrylcholinesterase genannt wird, wird in der Leber gebildet und von dort an das Blut abgegeben. Sie findet sich im Serum von Mensch, Pferd, Hund, Kaninchen und Rind. Pseudocholinesterase ist hemmbar durch Eserin, Prostigmin und verschiedene Organophosphate.

2. Dolantinesterase

Die aus Kaninchenleber isolierte Dolantinesterase ist sehr unspezifisch und sie spaltet außer Dolantin auch Nor-Dolantin, Tributyrin, L-Tyrosinäthylester, Propanidid und bestimmte Dipeptide. Das Enzym ist hochempfindlich gegen Organophosphate und Atoxyl, es ist kaum empfindlich gegen Eserin. (3). Dolantinesterase gleicht hinsichtlich ihrer Substratspezifität, ihres UV-Spektrums, ihres Verhaltens gegen E 600, Eserin, Atoxyl, NaF und gegen Metallsalze den Carboxylesterasen.

3. Procainesterase

Procainesterase ist identisch mit Pseudocholinesterase, da Benzoylcholin und Procain gleich schnell von dieser Esterase gespalten werden. Tetracain wird fünfmal langsamer und Piperocain sechsmal schneller als Procain hydrolysiert. Durch DFP, Eserin und Fluorid wird das Enzym gehemmt (15). Die Seren der verschiedenen Species weisen einen unterschiedlichen Gehalt an Procainesterase auf gemäß der Reihenfolge: Mensch > Pferd > Meerschweinchen > Kaninchen > Ratte > Hund > Schwein > Rind > Schaf. Die Leber, in der das Ferment gebildet wird, zeigt von allen untersuchten Organen die höchste Aktivität (29).

4. Parpanitesterase

Parpanitesterase, ein sehr spezifisches Ferment, wird in Leber und Nieren von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten gefunden.

Bei nur ungefähr 43% der untersuchten Kaninchen wurde eine Parpanitesterase-Aktivität im Serum festgestellt.

Parpanitesterase ist verschieden von Serumlipase, da Tributyrin nicht gespalten wird und im Gegensatz zur Serumlipase keine Empfindlichkeit gegen Atoxyl vorliegt. Eine vollständige Hemmung findet statt durch NaF und KCN (22). Die aus Kaninchenleber isolierte Parpanitesterase (M. Juma, unveröffentlicht) ist den Carboxylesterasen zuzuordnen. Sie wird durch 10^{-5} M Lösungen von Organophosphaten gehemmt und ist unempfindlich gegen Ca^{++}, SH-Blocker und EDTA. Sie gehört den ß-Globulinen an und sie besitzt ein pH-Optimum von 8,7.

5. Arylesterase

Arylesterasen werden im Serum von Mensch, Ratte, Kaninchen, Hund, Katze und Meerschweinchen gefunden. Sie spalten vorwiegend Ester aus Carbonsäuren und aromatischen Alkoholen (z.B. Phenylacetat, Acetylsalicylsäure, Phenylbutyrat und Phenylbenzoat), aber auch Verbindungen vom Typ des Mandelsäuremethylesters (1), jedoch keine aliphatischen Ester. Sie sind resistent gegen Organophosphate und gegen Physostigmin. Die meisten Arylesterasen zeigen im Vergleich zu den Carboxylesterasen und den Cholinesterasen die größte elektrophoretische Beweglichkeit und wandern meist zusammen mit der Albuminfraktion (7).

Hinsichtlich der Substratspezifität, der größeren Aktivität gegenüber Phenylacetat als gegenüber Phenylbutyrat und der Hemmbarkeit ist "Propanididesterase" in die Gruppe der Arylesterasen einzuordnen. Aufgrund des Km-Wertes bezüglich Prppanidid handelt es sich um eine unspezifische Arylesterase. Dolantin bzw. Parpanitesterase gehören einer anderen Gruppe von Esterasen an.

Die Resistenz gegen Physostigmin, Prostigmin, E 600 und DFP differenziert die aus Rattenleber isolierte "Propanididesterase" eindeutig von der Pseudocholinesterase, die im Humanserum für die Inaktivierung des Propanidids verantwortlich ist.

Tabelle 5: Eigenschaften der „Propanididesterase" und anderer synthetischer Pharmaka spaltender Esterasen

Vorkommen	Propanidid-esterase	Aryl-esterasen	Dolantin-esterasen	Procain-esterase	genet. bedingte Parpanitesterase	Pseudocholin-esterase
Leber	+	+	+	+	+	+
Serum	+	+	(+)	+	(+)	+
pH-Optimum	9, 0		9, 3	8, 5	8, 7	8, 5
Substrate:						
Acetylcholin	-	-	-	-	-	+
Tributyrin	-	-	+	+	+	+
Phenylacetat	+	+				
Phenylbutyrat	+	+			+	
Phenylbenzoat	+	+			+	
Acetylsalicylsäure	+	+				
Dolantin	-		+		+	
Procain	-		-	+	+	
Parpanit	-		-		+	
Hemmung Mol						
Prostigmin 10^{-3}	-	-				
Physostigmin 10^{-5}	-	-	-		+	+
E 600 10^{-4}	-	-	+		+	+
DFP 10^{-4}	-	-	+		+	+
Atoxyl	+		+		+	
Elektrophoret. Verhalten	ß-Glob.	Alb.	ß-Glob.		ß-Glob.	zwischen 2 u. ß-Globulinen
EDTA-Hemmung	-	+	-		-	
Ca^{++}-Aktivierung	-	+			-	
α, α' Dipyridyl	-					
o-Phenanthrolin	-					

4. Zusammenfassung

1. Aus Rattenleberhomogenat wurde in vier Schritten (2-fache Ammonsulfatfällung, Gel-Filtration an Sephadex G 100 und Chromatographie an DEAE-Sephadex) ein Ferment etwa 62-fach angereichert.

2. Die Anreicherung wurde durch eine modifizierte Hydroxamat-Methode (5.3.2) verfolgt.

3. Das angereicherte Enzym, das sich in der analytischen Ultrazentrifüge, bei der Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien und bei der Chromatographie an DEAE-Sephadex als einheitlich erwies, enthielt noch Spuren von Porphyrinen und Purinnucleotiden, wie aus dem UV-Spektrum hervorging.

4. Die für die Inaktivierung des Propanidids verantwortliche Esterase aus Rattenleber ist verschieden von dem entsprechenden Enzym im Humanserum.

5. Die Propanididesterase spaltet auch Acetylsalicylsäure, Phenylacetat, Phenylbutyrat und Phenylbenzoat und ist daher in die Gruppe der Arylesterasen einzuordnen. Sie ist inaktiv gegen Acetylcholin, Atropin, Cocain, Procain, Tributyrin, L-Tyrosinäthylester und Olivenöl.

6. Eine totale Hemmung erfährt Propanididesterase durch Atoxyl. Ca-oleat bewirkt eine 86proz., Natriumfluorid nur eine 19proz. Hemmung. Das Enzym ist unempfindlich gegen hohe Konzentrationen von E 600 und DFP sowie gegen Prostigmin und Physostigmin und daher von Cholinesterase unterschieden. Durch den für microsomale Enzyme bekannten Inhibitor SKFA entsteht eine 12proz. Hemmung.
   Durch Komplexbildner wird das Enzym nicht inaktiviert, woraus man schließen kann, daß es kein Metall enthält.

7. In Seren von Ratten, deren Lebern durch Thioacetamid nekrotisiert worden waren, konnte kein Anstieg der esteratischen Wirkung festgestellt werden, während die Transaminasen, wie erwartet, erhöht waren.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines

Die pH-Werte aller Puffer wurden mittels des pH-Meters E 300 der Fa. Methrom (Herisau/Schweiz) bestimmt. Die Inkubationen erfolgten in einem thermokonstanten Wasserbad der Fa. Haake.

5.2 Verwendete Chemikalien

Sämtliche Chemikalien sind, sofern nichts anderes angegeben, "p.A." oder "purissimum" - Präparate der Firmen Merck oder Riedel.

Ausnahmen hiervon:

Substanz und Qualität	Herstellerfirma	Lieferfirma
Propanidid (Epontol^{R})$^{+}$	Bayer	Bayer
Dolantin reinst^{++}	Hoechst	Hoechst
Alkohol-Standard nach Widmark	Merck	Merck
NAD und ADH Susp.	Boehringer	Boehringer
Semicarbacid p.A.	Hopkins & Williams Chadwell Heath Essex, England	KEPEC Chem. Fabrik Siegburg
Sephadex G-100	Pharmacia Uppsala/Schweden	Deutsche Pharmazie Frankfurt/Main
DEAE-Sephadex	dto.	dto.
Polyäthylenglykol, pract		Roth, Karlsruhe

Substanz und Qualität	Herstellerfirma	Lieferfirma
Acetylcholin		SERVA, Heidelberg
Tributyrin		SERVA-Heidelberg
Na-Taurocholat, reinst		SERVA, Heidelberg
Stickstoff, CO_2-frei	Messer-Griesheim	Saarbrücken
Atropin-Sulfat, DAB VI	Merck	Merck
Cocain-HCl	Merck	Merck
Caramiphen(Parpanit^R)$^{+++}$	Geigy, Basel	Geigy, Basel
Procain-HCl, DAB VI		MERCK
L-Leucyl-Glycin	Fluka	Roth, Karlsruhe
Glycyl-L-Prolin	Fluka	Roth, Karlsruhe
L-Prolin	MERCK	MERCK
DL-Leucin	Schuchardt	Schuchardt, München
L-Tyrosin, p.A.		SERVA, Heidelberg
L-Tyrosinäthylester-HCl	EGA-Chemie	EGA-Chemie
Alpha-Chymotrypsin	Boehringer	Boehringer
p-Arsanilsäure, rein	Fluka	Roth, Karlsruhe
Eserinsulfat, DAB VI		Merck
Na-Jodacetat		SERVA, Heidelberg
p-Chloromercuribenzoesäure, Na-Salz		Serva, Heidelberg
SKF 525 A		Serva, Heidelberg

Substanz und Qualität	Herstellerfirma	Lieferfirma
Trasentin 6 H++++	Ciba	Ciba
E 600, 99, 6%+++++	Bayer	Bayer
DFP, 0, 1%	Bootspure Drug Co. Ltd. Nottingham/England	Fluka

+ Für die Überlassung von Propanidid (Epontol^{R}) danke ich Herrn Dr. J. Pütter, Pharmakologisches Institut der Farbwerke Bayer, Wuppertal-Elberfeld.

++ Für die Überlassung von Dolantin danke ich Herrn Dr. Ruschig vom Hauptlabor der Farbwerke Hoechst.

+++ Für die Übersendung von Caramiphen (Parpanit^{R}) danke ich Herrn Dr. R. Pulver von der Fa. Geigy, Basel.

++++ Für die Überlassung von Trasentin bin ich der Fa. Ciba in Wehr/Baden sehr zu Dank verpflichtet.

+++++ Für die schnelle Besorgung von E 600 danke ich dem Bayer-Pharma-Büro, Mannheim.

5.3 Versuchsbeschreibungen

5.3.1 Herstellung des Homogenates

Die Lebern von 12 Tieren wurden sofort nach dem Töten in etwa 300 ml eiskaltes Aceton gegeben und in einem Glashomogenisator mit Teflon-Stempel (Fa. Braun, Melsungen) homogenisiert. Bei

Null bis 4^{o} wurde abgesaugt, der Rückstand zweimal mit kaltem Aceton aufgenommen, abgesaugt, mit Äther gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet. Das trockene "Acetonpulver" war bei $+4^{o}$ unbeschränkt haltbar.

Bei Bedarf wurden 3,5 g Acetonpulver in 35 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) bei $+4^{o}$ mit Hilfe eines Magnetrührers innerhalb von 14 Stunden gleichmäßig suspendiert (Präparation A). Die Präparation wurde 60 min (8500 g, 0^{o}) zentrifugiert (Präparation B).

5.3.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Bedingungen:

pH	9,0
Propanidid-Konzentration:	$6x10^{-3}$ M im Inkubationsansatz
Inkubationszeit	1 Stunde
Temperatur:	37^{o}
Wellenlänge:	546 nm (Photometer der Firma Netheler & Hinz, Hamburg)
Schichtdicke:	2 cm

Reagenzien:

a) Propanidid-Lösung: 12 mg Propanidid wurden in 1 ml 50proz. wässrigem Methylglykol gelöst;

b) Phosphatpuffer: 0,2 M, pH 9,0;

c) Alkalische Hydroxylamin-Lösung:

14proz. (g/v) wässriges NaOH und

14proz. (g/v) wässriges Hydroxylamin-hydrochlorid

wurden kurz vor Beginn der Messung zu gleichen Teilen gemischt.

d) Perchlorsäure: 6proz. (g/v) in Wasser

e) $FeCl_3$-Lösung: 5proz. in 0,1 n HCl (g/v)

Ausführung: Inkubationsansatz:

1 ml Reagenz a)

1 ml Enzymlösung (Präparation B)

4 ml Reagenz b)

Nach einer Stunde Inkubation bei 37° gab man 2 ml Reagenz c) zu und hielt weitere 30 min bei 37°. Nach Zugabe von 5 ml Reagenz d) wurde zentrifugiert (4000 u PM, 10 min), 1 ml des Überstandes mit 5 ml Reagenz e) vermischt und die Extinktion bei 546 nm gemessen.

Um die unter den angegebenen Reaktionsbedingungen erfolgende Eigenhydrolyse des Propanidids (12,5 % innerhalb der 1. Stunde) zu berücksichtigen, wurde stets der "Leerwert" in einem Parallelansatz mitbestimmt, indem anstelle der Enzymlösung 1 ml Wasser eingesetzt wurde. Die enzymatische Aktivität ergab sich aus den Extinktionsdifferenzen zwischen den Parallelansätzen.

5.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messungen wurden in einem Spektralphotometer DK-1A der Fa. Beckmann nach Angabe (14) durchgeführt.

5.3.4 Zellfraktionierung durch Differentialzentrifugation

Die nach 5.3.1 erhaltene Präparation A wurde zur Abtrennung der Zellkerne 10 min in der Kühlzentrifuge (Fa. Christ) bei 600 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden innerhalb von 10 min bei 8500 g die Mitochondrien sedimentiert. Bei 60 min Zentrifugieren (105000 g) in der präparativen Ultrazentrifuge (Modell L der Fa. Beckmann) erfolgte die Abtrennung der Microsomenfraktion. Jede Fraktion wurde dreimal mit Phosphatpuffer (pH 9, 0) gewaschen, bevor sich eine Bestimmung der spezifischen Aktivitäten anschloß.

5.4 Anreicherung des Enzyms

Alle Anreicherungsverfahren werden bei 1-3° durchgeführt.

5.4.1 Fällung mit Ammoniumsulfat

Die nach 2.3.1 gewonnene Präparation B wurde unter Eiskühlung mit 21 ml einer gesättigten wässrigen $(NH_4)_2 SO_4$-Lösung verrührt. Nach 10 min bei 10 000 UPM wurde in der Kühlzentrifuge das ausgefallene Protein sedimentiert. Der Überstand wurde mit weiteren 28 ml $(NH_4)_2SO_4$-Lösung versetzt, wodurch eine 73proz.

Sättigung erzielt wurde. Nach weiteren 10 min wurde nochmals zentrifugiert und das Sediment in 3 ml Trispuffer (0, 05 M, pH 9, 0) gelöst.

5.4.2 Gelfiltration an Sephadex G-100

Die Gelfiltration erfolgte bei 0-4° mit Hilfe der in Abb. 16 schematisch wiedergegebenen Apparatur. Als Säule diente ein Sephadex-Chromatographierrohr K 25/100, das mit einem Kopfstück mit verstellbarem Kolben ("upward flow-adapter") versehen war (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden). Als Durchflußanalysator diente ein Durchflußphotometer (LKB 8300A, Unicord II) mit einem Fallbügelschreiber (LKB 6520A). Über ein Zweigventil war ein Fraktionensammler "Radirac" (Fa. LKB-Produktor AB, Stockholm 12, Schweden) angeschlossen. Die Schlauchpumpe wurde von der Fa. Desaga, Heidelberg, geliefert.

Die nach 5.4.1 erhaltene Enzymlösung wurde von unten in die mit Tris-Puffer (0, 05 M, pH 9, 0) gewaschene Säule gepumpt und diese mit gleichartigem Tris-Puffer eluiert. Der Proteingehalt des Eluats (Fraktionen zu je 4 ml) wurde kontinuierlich bei 280 nm gemessen (Durchflußzelle mit 3 mm Schichtdicke) und die Extinktion registriert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 12 ml/Std. Die gesamte Eluation erforderte etwa 24 Std.

Die enzymhaltigen Fraktionen (48 ml) werden vereinigt und durch Einhängen eines mit Polyäthylenglykol (Molekulargewicht: 20000) gefüllten Dialysierschlauches (17) auf 3-4 ml eingeengt.

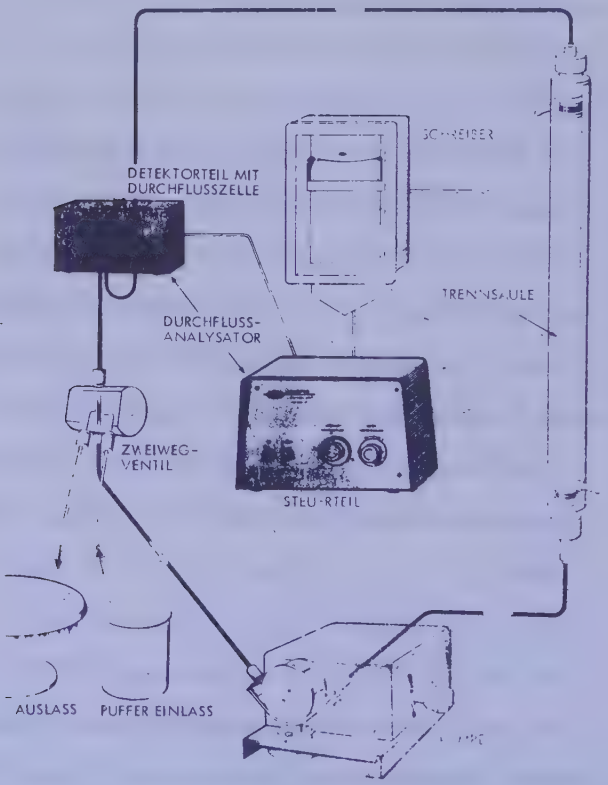


Abb. 16: Schematische Darstellung der zur Gelfiltration und zur Säulenchromatographie verwendeten Apparatur

5.4.3 Chromatographie an DEAE-Sephadex

Anstatt der bei 5.4.2 angegebenen Trennsäule wird eine Glassäule (50x2 cm) mit eingeschmolzener Glasfritte und 2 Kugelschlitten verwendet. Ferner wird das Puffer-Einlaßgefäß durch eine in Abb. 17 angegebene Gradienten-Apparatur ersetzt.

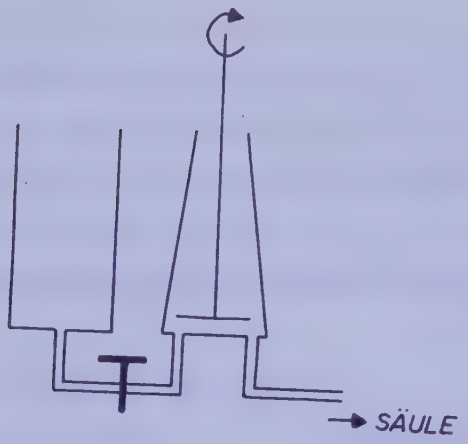


Abb. 17: Gradienten-Apparatur zur Chromatographie an DEAE-Sephadex

In den Erlenmeyer-Kolben der Gradientenapparatur werden 250 ml Tris-Puffer (0,05 M, pH 9,0 + 0,05 M NaCl) gegeben, das Becherglas wird bis zur gleichen Höhe mit Tris-Puffer (0,05 M, pH 9,0 + 0,2 M NaCl) gefüllt.

Das DEAE-Sephadex wird nach dem von der Herstellerfirma angegebenen Verfahren "A" aufbereitet und in die Säule eingefüllt. Zwei der nach 5.4.2 erhaltenen Enzympräparationen werden von oben in die Säule eingepumpt und kontinuierlich mit dem angegebenen NaCl-Gradienten eluiert. Es werden 14 Fraktionen zu je 4 ml aufgefangen. Die gesamte Elution ist in ungefähr 36 Stdn. beendet.

Der Verlauf des Gradienten wird mit einer Philipps-Leitfähigkeitsmeßbrücke (Typ PR 9500) und einer Eintauchmeßzelle (Typ PR 9513) festgestellt.

Die Molarität an Kochsalz wird mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt.

5.4.4 Elektrophorese

Die nach 5.4.3 erhaltene Enzymlösung wird wie bei 5.4.2 eingeengt und gegen Veronalpuffer dialysiert. Nach Gefriertrocknung wird der Rückstand in wenig Veronalpuffer gelöst und die Lösung mit einem Stempel auf die pufferfeuchten Streifen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in der Microzonenelektrophoreseapparatur (Modell R-100 der Fa. Beckmann, München).
Trägermaterial: Celluloseacetatmembran (Fa. Beckmann)
Puffer: Veronal-Puffer, pH 8,6, Ionenstärke: 0,075.

Laufzeit: 20 min.

Feldstärke: 17 Vol/cm

Färbemittel: Ponceaurot-S.

Nach beendeter Elektrophorese wurde 10 min in einer "Fixier-Farbstoff-Lösung" (Original-Lösung der Fa. Beckmann) fixiert und das Protein angefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde mit 5proz. Essigsäure entfernt. Die Folien werden durch einmaliges Einlegen in Methanol entwässert, in ein Transparentbad (Methanol/Eisessig 9:1) gelegt und bei 60° getrocknet.

Unter gleichen Bedingungen wurde Rattenserum aufgetrennt. Das Enzymprotein wurde durch Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeiten als ß-Globulin identifiziert.

5.5.5 Untersuchung von Substraten

5.5.5.1 Acetylsalicylsäure

Die enzymatische Hydrolyse des Salicylsäureesters wurde in Anlehnung an die Vorschrift von E. Bamann (9) verfolgt. Es wurde ein Kombititrator (Fa. Methrom, Herisau, Schweiz) bestehend aus Impulsomat (E 373), pH-Meter (E 300 B) und Dosimat mit eingebautem Schreiber benutzt. Das Volumen der automatischen Bürette beträgt 10 ml.

30 ml einer 0,22 M Lösung des Substrats in 1 N NaOH wurde in das Reaktionsgefäß gegeben und bei 37° unter CO_2-freiem

Stickstoff mit 0,1 N NaOH auf pH 7,0 vortitriert. Nach Kontrolle der Eigenhydrolyse wird die Enzymlösung zugegeben und die enzymatische Esterspaltung während 2 Stdn. bei konstantem pH (7,0) und konstanter Temperatur (37°) durch automatische Titration mit 0,1 N NaOH verfolgt.

5.5.5.2 Phenylacetat

5.5.5.3 Phenylbutyrat

5.5.5.4 Phenylbenzoat

Die Hydrolyse aller drei Arylester wurde nach K.B. Augustinsson (6) bei pH 7,4 und in 0,01 M Lösung wie bei 5.5.5.1 gemessen.

5.5.5.5 Dolantin

Die Enzymaktivität wurde durch enzymatische Bestimmung des bei der Hydrolyse entstehenden Äthanols gemessen (3).

5.5.5.6 Tributyrin

Die bei der Hydrolyse freigesetzte Buttersäure wird wie bei 5.5.5.1 verfolgt. Kurz vor dem Test wird mit Hilfe eines Homogenisators (Fa. Bühler, Tübingen) eine 20proz. Emulsion von Tributyrin in 10proz. wässrigem Gummiarabicum hergestellt. 20 ml der Emulsion werden in das Reaktionsgefäß gegeben und unter Rühren und Begasung mit CO_2-freiem Stickstoff auf 37°

gebracht. Dann wird mit 0,1 N NaOH auf pH 8,6 vortitriert. Nach Kontrolle der Eigenhydrolyse wird die Enzymlösung zugegeben und die enzymatische Esterspaltung während 5 min bei konstantem pH 8,6 und konstanter Temperatur (37°) durch automatische Titration mit 0,1 N NaOH verfolgt.

5.5.5.7 Procain

Die Procainspaltung wird photometrisch gemessen. Die Methode beruht darauf, daß der p-Aminobenzoesäureester des Diäthylaminoäthanols (Procain) bei 300 nm viermal stärker absorbiert als p-Aminobenzoesäure. 2 ml Procainlösung ($3,0 \times 10^{-4}$ M in 0,1 M Tris-Puffer, pH 8,2) und 1 ml Enzymlösung werden in eine Küvette (Schichtdicke: 0,5 cm) pipettiert. Man mißt sofort die Extinktion (Photometer DK 1-A der Fa. Beckmann) und inkubiert 2 Stdn. bei 37°. Eventuell ausgefallenes Eiweiß wird schnell abzentrifugiert und die Extinktion nochmals gemessen.

5.5.5.8 Dipeptide

In 1 ml der nach 2.3.3 erhaltenen Enzympräparation werden 10 mg des zu untersuchenden Dipeptides gelöst. 0,01 ml des Gemisches werden entnommen und sofort auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Der Rest des Gemisches wird bei 37° inkubiert, nach 1, 3 und 8 Stdn. werden jeweils 0,01 ml entnommen

und ebenfalls sofort aufgetragen.

Die Dünnschichtchromatographie wird wie folgt durchgeführt:

Trägermaterial: Kieselgel-G

Laufmittel: (bei Kammersättigung)

für Glycyl-L-Prolin: Phenol/H_2O (75:25g/g)

für L-Leucyl-Glycin: Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)

Laufzeit: ca. 2 Stdn.

Trocknung: 20 min im Luftstrom

Anfärbung: Ninhydrin und Erhitzen auf 110°, 10 min.

5.5.5.9 L-Tyrosinäthylester-hydrochlorid

Die enzymatische Spaltung wurde nach W. Rick (25) verfolgt. Anstatt des angegebenen Spektralphotometers PMQ II der Fa. Zeiss wurde ein Spektralphotometer DK 1-A der Fa. Beckmann benutzt. Es wurde mit "slit servo" gearbeitet. Die Spaltbreite betrug etwa 1, 5 mm.

5.5.6 Inhibitoren

Es wurde jeweils die Spontanhydrolyse von Propanidid in Gegenwart des Inhibitors gemessen und diese vom "Vollwert" (Propanididesterase + Propanidid + Inhibitor) abgezogen. Zur Bestimmung des "Vollwertes" wurde Enzymlösung, zur Bestimmung der Eigenhydrolyse von Propanidid ein gleiches Volumen 0, 2 M Phosphatpuffer zugegeben und nach 5.3.2 verfahren.

E 600 und DFP wurden in Methylglykol suspendiert und dem Inkubationsansatz in 10^{-5} M bzw. 10^{-4} M Endkonzentration zugesetzt. Um DFP und E 600 in Suspension zu halten, wurde der Ansatz während der gesamten Inkubationszeit gerührt.

0,01 ml der Ansätze wurde auf eine Dünnschichtplatte aufgetr[illegible]

Trägermaterial: Kieselgel-G (2 Stdn. bei 110^{o} aktiviert).

Laufmittel: Äthanol (96%/konz. Ammoniak/H_2O)
(5 : 2 : 3)

Laufzeit: ca. 70 Min.

Anfärbung: Jod.

6. Literatur

1. Ammon, R. — In: Fermente, Hormone, Vitamine Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959, S. 152.

2. Ammon, R. und H. Bockenfahl — In:H. U. Bergmeyer:"Methoden der enzymatischen Analyse" Verlag Chemie GmbH, Weinheim/ Bergstraße, 1962, S. 771.

3. Ammon, R. und V. Kamphues — Enzymologia (im Druck).

4. Ammon, R. und W. Merck — Enzymologia 36, 239 (1969).

5. Ammon, R. und M. Piroth — Gastroenterologia 3, 92 (1965).

6. Augustinsson, K. B. — Acta chem. scand. 13, 571 (1959).

7. Augustinsson, K. B. — Nature (London) 181, 1786 (1958).

8. Ball, E. G. und O. Cooper — J. biol. Chemistry 180, 113 (1949).

9. Bamann, E. — Hoppe Seyler´s Z. physiol. Chem. 222, 128 (1933).

10. Desnuelles, P., M. J. Constantin und A. Baldy — Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) 37, 285 (1955).

11. Duhm, B. W. Maul, H. Medenwald, K. Patschke und L. Wegner — In: K. Horatz, R. Frey und M. Zindler: "Die intravenöse Kurznarkose mit dem Phenoxyessigsäurederivat Propanidid", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1965, S. 78.

12. Hestrin, S. — J. biol. Chemistry 180, 249 (1949).

13. Hiltmann, R. — In: K. Horatz, R. Frey und M. Zindler: "Die intravenöse Kurznarkose mit dem Phenoxyessigsäurederivat Propanidid", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1965, S. 61.

14.	Kalckar, H. M.	J. biol. Chemistry 167, 561 (1947).
15.	Kalow, W.	J. Pharmacol. exp. Therapeut. 104, 122 (1952).
16.	Knabe, J.	"Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, 1966, S. 199.
17.	Kohn, A.	Nature (London) 183, 1055 (1959).
18.	Krisch, K.	Biochem. Z. 337, 554 (1963).
19.	Krisch, K.	Biochem. Z. 337, 531 (1963).
20.	Marchis-Mouren, G., G. L. Sardo und P. Desnuelles	Arch. Biochemistry 83, 309 (1959).
21.	Netter, K. J.	Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 235, 498 (1959).
22.	Pulver, R.	Arch. int. Pharmacodynam. Therap. 86, (Fasc. 2) 185.
23.	Pütter, J.	In: K. Horatz, R. Frey und M. Zindler: "Die intravenöse Kurznarkose mit dem Phenoxyessigsäurederivat Propanidid", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1965, S. 61.
23a)	Pütter, J.	Vortrag auf der Tagung für biochemische Analytik in München 30. 5. 1968.
24.	Rick, W.	in Vorbereitung aus K. Krisch, Biochem. Z. 337, 573 (1963).
25.	Rick, W.	In: H. U. Bergmeyer: "Methoden der enzymatischen Analyse", Verlag-Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße, 1962, S. 802.
26.	Roodyn, D. B.	Biochem. J. 80, 9 (1960).
27.	Schneider, W. C.	J. biol. Chemistry 176, 259 (1948).
28.	Schwert, G. W. und Y. Takenaka	Biochim. biophys. Acta 16, 570 (1955).

29.	Terp	Acta pharmac. tox. K'hun 9, 374 (1953).
30.	Willstädter, R. und F. Memmen	Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 129, 1 (1923).
31.	Wirth, W. und F. Hoffmeister	In: K. Horatz, R. Frey und M. Zindler: "Die intravenöse Kurznarkose mit dem Phenoxyessigsäurederivat Propanidid", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1965, S. 17, 47.

Lebenslauf

14. 11. 1936	geboren als Tochter des Amtsgerichtsrates Alfons Quintenz und seiner Frau Maria geb. Bolz, in Ellwangen/Jagst
1943 - 1947	Besuch der Volksschule in Schwäbisch Gmünd
1947 - 1956	Besuch des Hans-Baldung-Gymnasiums in Schwäbisch Gmünd
1. 3. 1956	Reifeprüfung am Hans-Baldung-Gymnasium in Schwäbisch Gmünd
1956 - 1958	Praktikantin in der Einhorn-Apotheke in Schwäbisch Gmünd
5. 9. 1958	Pharmazeutisches Vorexamen in Stuttgart
1958 - 1962	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
27. 7. 1962	Pharmazeutisches Staatsexamen
1962 - 1963	Kandidatenzeit in der Schwan-Apotheke in Heidelberg
31. 10. 1963	Bestallung als Apothekerin
1963 - 1965	Praktikantin der Lebensmittelchemie am Chemischen Landesuntersuchungsamt Sigmaringen

25. 11. 1965	Lebensmittelchemikerhauptprüfung an der TH in Stuttgart
seit 1.12.1965	Doktorandin am Physiol. Chemischen Institut der Universität des Saarlandes